

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-275648

(P2006-275648A)

(43) 公開日 平成18年10月12日(2006. 10. 12)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	
	GO 1 N 33/53 S	

審査請求 未請求 請求項の数 3 OL (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2005-92784 (P2005-92784)	(71) 出願人	505026686 国立大学法人滋賀大学 滋賀県彦根市馬場一丁目1番1号
(22) 出願日	平成17年3月28日 (2005. 3. 28)	(71) 出願人	504300088 国立大学法人帯広畜産大学 北海道帯広市稲田町西2線11番地
		(71) 出願人	000231637 日本製粉株式会社 東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目27番5号
		(71) 出願人	393017535 コスモ食品株式会社 東京都中央区日本橋小伝馬町12番2号
		(71) 出願人	596075417 財団法人十勝圏振興機構 北海道帯広市西5条南7丁目1番地 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト血液型試薬

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 プナシメジから精製される A G L を生理活性物質として有効活用することにある。

【解決手段】 第1の本発明に係る、プナシメジから精製される構造式：Ga1 1 - 3 (Fuc 1 - 2) Ga1 1 - 6 Man 1 - 2 Ins - P - Cer から成る B 型糖脂質のマイコグリコリピドは、Ga1 1 - 3 (Fuc 1 - 2) Ga1 の構造式を有しており、この構造式は B 型抗原構造で、ヒト血液型判定の試薬として安価に利用することができる。プナシメジのマイコグリコリピドの有効活用ができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ブナシメジから精製される構造式： $\text{Ga1-3(Fuc-2)Ga1-6Man-1-2Ins-P-Cer}$ から成る B 型糖脂質のマイコグリコリピドを抗原として使用することを特徴とするヒト血液型試薬。

【請求項 2】

ブナシメジから精製される構造式： $\text{Fuc-2Ga1-6Man-1-2Ins-P-Cer}$ から成る O 型糖脂質のマイコグリコリピドを抗原として使用することを特徴とするヒト血液型試薬。

【請求項 3】

ブナシメジから精製される構造式： $\text{Fuc-2Ga1-6Man-1-2Ins-P-Cer}$ から成る O 型糖脂質のマイコグリコリピドに、人胃癌由来の細胞株の A 型糖転移酵素により A 型糖脂質のマイコグリコリピドを合成して抗原として使用することを特徴とするヒト血液型試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト血液型試薬に関し、詳しくは、キノコ、特にブナシメジから精製されるマイコグリコリピド（AGL と略す。キノコの酸性糖脂質あるいはイノシトールリン酸性糖脂質とも称される。）を類似ヒト血液型抗原として使用するヒト血液型試薬に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年の急速な高齢化社会の進展と食生活の変化による生活習慣病の増加は、健康への関心を高め、キノコの生理活性が注目されている。

キノコは生活習慣病を始めとして癌や慢性関節リュウマチ、アトピー性皮膚炎などの疾病に効果があるとされ、食用キノコに含まれる新たな有用物質の探索やその生理活性に興味を持たれている。

【0003】

特にキノコの AGL の生理活性としては、イノシトールリン酸セラミド型の糖脂質がマウスへの免疫実験において、毒性のない良好なアジュバンド活性を有することやヒトや動物の血清中に一部のイノシトールリン酸セラミド型糖脂質を認識する抗体が存在することなどが報告されている。

【0004】

キノコの中でもブナシメジには、特に AGL が多く含まれ、このブナシメジから精製される AGL の有効活用が望まれる。

【0005】

本発明者は、このブナシメジから精製される AGL につき、更に鋭意検討研究した結果、この AGL の有効活用方法を明らかにした。

【特許文献 1】特開 2001-89494 号公報

【特許文献 2】特開 2004-166646 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、ブナシメジから精製される AGL を生理活性物質として有効活用することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、ブナシメジに含まれるマイコグリコリピドに含有される化合物について、鋭意検討を重ねた結果、ヒト血液型 O 型抗原構造、B 型抗原構造、A 型抗原構造を有する

10

20

30

40

50

ことを見出し、本発明に至った。

【発明の効果】

【0008】

第1の本発明に係る、ブナシメジから精製される構造式： $G a 1 \quad 1 - 3 (F u c \quad 1 - 2) G a 1 \quad 1 - 6 M a n \quad 1 - 2 I n s - P - C e r$ から成るB型糖脂質のマイコグリコリピドは、 $G a 1 \quad 1 - 3 (F u c \quad 1 - 2) G a 1$ の構造式を有しており、この構造式はB型抗原構造で、ヒト血液型判定の試薬として安価に利用することができ、ブナシメジのマイコグリコリピドの有効活用ができる。

【0009】

第2の本発明に係る、ブナシメジから精製される構造式： $F u c \quad 1 - 2 G a 1 \quad 1 - 6 M a n \quad 1 - 2 I n s - P - C e r$ から成るO型糖脂質のマイコグリコリピドは、 $F u c \quad 1 - 2 G a 1$ の構造式を有しており、この構造式はO型抗原構造で、ヒト血液型判定の試薬として安価に利用することができ、ブナシメジのマイコグリコリピドの有効活用ができる。

【0010】

第3の本発明に係る、ブナシメジから精製される構造式： $F u c \quad 1 - 2 G a 1 \quad 1 - 6 M a n \quad 1 - 2 I n s - P - C e r$ から成るO型糖脂質のマイコグリコリピドに、人胃癌由来の細胞株のA型糖転移酵素によりA型糖脂質のマイコグリコリピドを合成することができるので、ヒト血液型判定の試薬として安価に利用することができ、ブナシメジのマイコグリコリピドの一層の有効活用ができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明に係る第1、2の発明であるマイコグリコリピドを見出した分析方法につき説明する。

これまでに報告されているキノコの酸性糖脂質（マイコグリコリピドあるいはイノシトールリン酸性糖脂質とも称される）の化学構造は、マンノース-イノシトールリン酸セラミド（ $M a n - I n s - P - C e r$ ）をコアーとして、更に、ガラクトースやフコース等が結合したものである。

【0012】

以下に構造解析を行ったブナシメジのマイコグリコリピドについて述べる。
市販のブナシメジを50で乾燥後、クロロホルム-メタノール-水（60：35：8）により総脂質を抽出した。

【0013】

総脂質を弱アルカリ及び弱酸性処理して調整した粗スフィンゴ脂質画分をイオン交換セファデックスカラムクロマトグラフィーによって分画した。

得られた酸性糖脂質画分をイアトロピーズカラムクロマトグラフィーに処し、7種のマイコグリコリピド（TLC上での移動度の大きい順にAGL-0～AGL-6と仮称）をそれぞれ単離、精製した。

【0014】

カラムからの溶出は、クロロホルム-メタノール-3Mアンモニア（70：30：3～50：50：17）の濃度勾配溶出法及びn-プロパノール-水-アンモニア（75：15：5及び75：20：5）の単一溶媒溶出法を用いた。

【0015】

単離した7種のマイコグリコリピドは、いずれもリン検出試薬のHanes-Isherwood試薬に陽性を示し、更に、AGL-1～AGL-6はorcinol-硫酸試薬にも陽性であった（図1、図2）。

【0016】

構成糖種はメチルグリコシドTMS-誘導体として、糖鎖結合位置は部分メチル化アルジトールアセテート誘導体として、それらのGC及びGC-MS分析によって決定した（図3）。

10

20

30

40

50

【0017】

更に、イノシトールリン酸部分の構造を酸加水分解生成物からのイノシトールリン酸及びイノシトールの同定と、フッ化水素酸による分解成績体からのセラミドの回収及びその解析によって確認した。

【0018】

また、マンノースが結合するイノシトールの水酸基の位置 (Man Ins) は、主として過ヨウ素酸酸化によるフラグメント成績体の構造解析の結果により決定した。

【0019】

一方、MALDI-TOF MS分析では、セラミド組成を考慮した推定分子量に相当する分子量ピークが得られた。

10

即ち、7種のマイコグリコリピドは、AGL-0に順次マンノース (m/z 162)、ガラクトース (m/z 162)、フコース (m/z 148)、ガラクトース (m/z 162)、ガラクトース (m/z 162) 及びガラクトース (m/z 162) 分に相当する分子量の増加することがわかった (図4)。

【0020】

糖のアノマー配置は¹H-NMR分析によったが、1つのガラクトースが α -アノマーである他は、すべて β -アノマーであった (図5)。

以上のことから、ブナシメジの7種のマイコグリコリピドの構造を次のように決定した。

【0021】

AGL-0: Ins-P-Cer; AGL-1: Man₁₋₂Ins-P-Cer;
AGL-2: Gal₁₋₆Man₁₋₂Ins-P-Cer; AGL-3: Fuc₁₋₂Gal₁₋₆Man₁₋₂Ins-P-Cer;
AGL-4: Gal₁₋₃(Fuc₁₋₂)Gal₁₋₆Man₁₋₂Ins-P-Cer; AGL-5: Gal₁₋₂Gal₁₋₃(Fuc₁₋₂)Gal₁₋₆Man₁₋₂Ins-P-Cer;
AGL-6: Gal₁₋₂Gal₁₋₂Gal₁₋₃(Fuc₁₋₂)Gal₁₋₆Man₁₋₂Ins-P-Cer。

20

【0022】

セラミド組成については、これらのマイコグリコリピドのすべてが、長鎖塩基はフィトスフィンゴシンのみを成分とし、一方、脂肪酸はAGL-0がC16及びC18の飽和酸とC18, C22, C24の2-ヒドロキシ酸のそれぞれを成分とするのに対し、AGL-1~AGL-6は、2-ヒドロキシ酸のみを構成成分としていた (図6)。

30

【0023】

これらのマイコグリコリピドの構造を、既に報告されているブナシメジと分類学上で同目のツクリタケのそれら (Gal₁₋₆Gal₁₋₆Gal₁₋₆(Fuc₁₋₂)Gal₁₋₆Man₁₋₂Ins-P-Cer) と比較したところ、構成糖種は同一であるが、非還元末端からのガラクトースの結合に違いが認められた。

【0024】

ツクリタケを含めタマゴテングダケ、ホコリタケ、ヤマドリタケ、アンズタケ、シイタケ、ヒラタケ等、今までに報告されているマイコグリコリピドは、全てに共通した骨格構造であるイノシトールリン酸セラミドにマンノースが α 1-2結合している。

40

【0025】

そして更に、マンノース、ガラクトース及び分岐でフコースが結合して、それらの組み合わせによって糖鎖が延長している。

【0026】

ブナシメジを含め、前述のエリンギにおいても、それぞれのキノコを特色付けるマイコグリコリピドが存在することは、それらを食用として摂取する動物 (特に、ヒト) に及ぼす影響等、生理活性についても関心が寄せられるところである。

【0027】

また、ブナシメジのマイコグリコリピドの糖鎖の非還元末端構造に注目すると、AGL

50

- 3のFuc 1 - 2 Ga 1はヒト血液型のO型抗原構造を有し、AGL - 4のGa 1 1 - 3 (Fuc 1 - 2) Ga 1はB型抗原構造を有している。

【0028】

TLC上でのそれぞれの抗体との反応性を調べるTLC - immunostainingでは、AGL - 4は血液型判定抗血清及び抗体あるいはA型の血液型血清中に含まれる抗B抗体により認識された。

一方、AGL - 3は、O型糖鎖を認識するレクチンにより検出された。

【0029】

第3の本発明に係る一実施例を説明する。

最初の、材料としては、人胃癌由来の細胞株、H型糖脂質 (AGL - 3)、Fuc 1 - 2 Ga 1 1 - 6 Man 1 - 2 Ins - P - Cer、B型糖脂質 (AGL - 4)、Ga 1 1 - 3 (Fuc 1 - 2) Ga 1 1 - 6 Man 1 - 2 Ins - P - Cer、UDP - GalNAc (糖転移酵素反応のドナー基質)、薄層プレート、抗A型抗体 (モノクローナル抗体、ダコ社製)、セパックC18逆層クロマトカートリッジを用いる。

【0030】

次に、方法に付き説明する。

細胞培養

上記の2種の細胞株をRPMI 1640 / 10% FCSで培養し、 4×10^7 細胞を得る。

この細胞をホモジネート処理し、これを酵素源とする。比活性を上げるために100 . 000 G上清のマイクロゾームリッチ画分を用いる。

【0031】

酵素反応

基質：H型糖脂質 (AGL - 3)	10 ug / 50 ul (チューブ)
緩衝系：カコジル酸バッファー (pH 6 . 5)	100 mM
MnCl ₂	10 mM
Triton X - 100	0 . 3 %
糖供与体：UDP - GalNAc	0 . 085 mM

【0032】

in vitro合成経路は次のとおりである。

Fuc 1 - 2 Ga 1 1 - 6 Man 1 - 2 Ins - P - Cer + UDP
H型糖脂質 (AGL - 3)

Ga 1 NA c 1 - 3 (Fuc 1 - 2) Ga 1 1 - 6 Man 1 - 2 Ins - P - C
er + UDP 合成されるA型糖脂質

反応液は50 ulで行う。基質のAGL - 3は先に有機溶媒を除いておく。そのチューブに緩衝液、Triton X - 100、MnCl₂、UDP - GalNAcを加え最後に酵素液を加え37、3時間反応を行う。

【0033】

C18逆層クロマトカートリッジを用いた反応産物の精製

上記の酵素反応でH型糖脂質 (AGL - 3)を基質にして糖転移酵素反応により、もう一方の基質であるUDP - GalNAcからN - アセチルガラクトサミン (GalNAc)がAGL - 3に移りA型糖脂質がin vitroで生合成される。

【0034】

A型糖転移酵素として、N - アセチルガラクトサミン転移酵素を使用している。

【0035】

反応生成物のA型糖脂質は基質 (AGL - 3)に比べて、非常に微量であるため酵素反応終了後、反応液から更に脂質を精製する。

【0036】

終了後反応チューブへ1 mlの水を加え懸濁し、溶液すべてを予め平衡化していたC18逆層クロマトカートリッジにのせる。自然落下で溶出液をチューブに分取する。

10

20

30

40

50

更にもう 1 m l の水を加え、カートリッジを十分洗い込む。

【 0 0 3 7 】

次に、メタノール 2 m l、クロロホルム / メタノール、2 / 1 混液 2 m l を次々に流し、脂質をカートリッジから溶出し、別のガラスチューブで分取する。

C 1 8 逆層クロマトカートリッジでは水系で過剰の酵素蛋白質、UDP - GalNAc が洗い出され、最後に有機溶媒 (クロロホルム / メタノール混液) で脂質がカートリッジから溶出する。

逆層の高速液体クロマトグラフィーの原理と同じである。

【 0 0 3 8 】

薄層クロマトグラフィーと TLC 免疫染色法

カートリッジから溶出された有機溶媒に脂質が存在するので、チューブの溶媒をエアポンプで飛ばし、少量の溶媒 (5 0 u l ぐらい) で脂質を溶かし、通常の方法で展開溶媒 (C / M / W : 6 0 / 3 5 / 8) を用いて TLC で脂質を展開する。

【 0 0 3 9 】

その後、抗 A 型抗体 (モノクローナル抗体) を用いて免疫染色し、生じた A 型糖脂質を検出する。発色には酵素抗体法 (コニカイムノステイン法) あるいは E L C 法を使用する。

通常これらの反応は放射性同位体 (^{14}C 、UDP - GalNAc) を用いて、反応後、薄層クロマトグラフィーに展開後、X 線のフィルムの感光によるオートラジオグラフィ法で検出する方法が使われているが、感度が問題にならないければ別の方法を使うことができる。

【 0 0 4 0 】

未反応の H 型糖脂質もこの系の中に存在するが、同じ脂質なので薄層クロマトグラフィーでは分離できるので問題ない。使う抗体は抗 A 型抗体 (モノクローナル抗体) なので、他の H 型糖脂質のような糖脂質とは交叉反応しない。検出感度の問題である。酵素活性が高ければ確実に検出できる。

【 0 0 4 1 】

この結果、レーン 1 は A 型赤血球膜より調整した中性糖脂質画分を薄層クロマトグラフィーにのせた。右の抗体による反応では抗 A 型抗体で反応する主要な糖脂質が上から A^a、A^b、A^c バンドが確認できた。

【 0 0 4 2 】

これに対し、ヒト細胞株より調整した酵素画分を用いて反応させたレーン 2 では酵素を加えないレーン 3 の反応に比べて免疫染色で検出された。そして、そのバンドは A 型糖脂質のバンドが基質であるキノコ由来の H 型糖脂質の下に検出され、構造としては図 7 の構造であると考えられる。

類似のヒト細胞株でも同様な結果が得られた。

【 0 0 4 3 】

ブナシメジの酸性糖脂質画分には人血液型類似糖脂質、H 型糖脂質、B 型糖脂質がかなり多く存在する。これらの正確な構造が決定された。

抗体との反応性も殆ど差はなく、今までの血液型判定用には赤血球そのものを抗体と直接反応させていたが、ブナシメジ由来の糖脂質を用いれば代替品として、使用できる。

【 0 0 4 4 】

更に実用化のためには血液型の判定や輸血の際には表試験、裏試験のクロスマッチが必要であるが、キノコ由来の糖脂質を用い、しかも構造既知の H 型糖脂質の前駆体を用いて *in vitro* で A 型糖脂質を合成できる方法を確立できたことは、安価な血液型類似糖脂質を供給できる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 5 】

【 図 1 】 リン酸検出試薬と硫酸試薬の場合の説明図。

【 図 2 】 図 1 に示す試薬を行う際の説明図。

10

20

30

40

50

【図3】 AGLのGC及びGC-MS分析説明図。

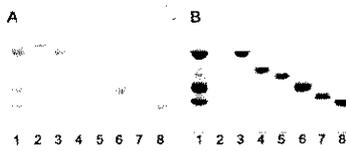
【図4】 AGLのMALDI-TOF MS分析説明図

【図5】 AGLのH-NMR分析説明図

【図6】 AGLのセラミド組成の説明図。

【図7】 キノコ糖脂質を用いたA型糖脂質の*in vitro*合成を示す説明図

【図1】

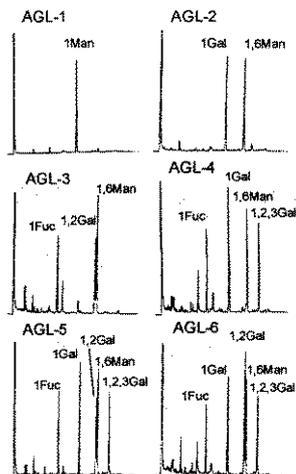


【図2】

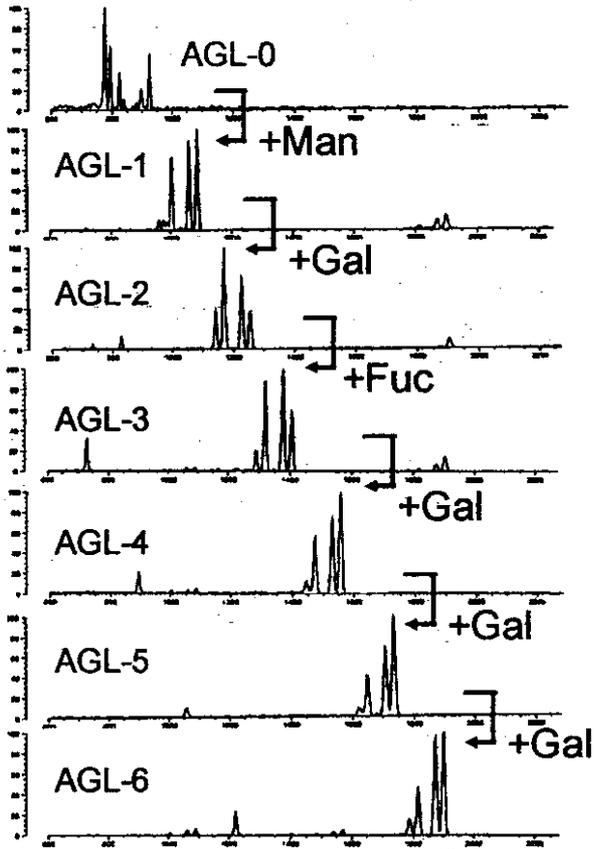
Table 2 Mycoglycolipid in *H. marmoreus*.

Wet weight	(g)	100
Dryweight	(g)	8.85
Sphingolipid fr.	(mg)	71.7
Mycoglycolipid	(mg)	37.1
for Wet weight	(%)	0.04
for Dry weight	(%)	0.42
for Sphingolipid fr.	(%)	51.7

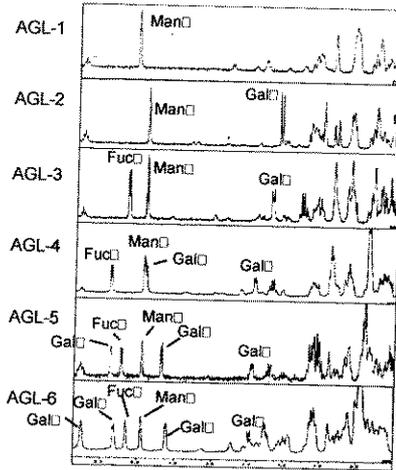
【図3】



【 図 4 】



【 図 5 】



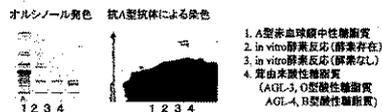
【 図 6 】

Table 3 Ceramide Compositions of AGL-0~AGL-6.

	(%)	AGL-0	AGL-1	AGL-2	AGL-3	AGL-4	AGL-5	AGL-6
FA	16:0	27.0	tr.	3.2	tr.	7.1	4.9	tr.
	h16:0	11.4	tr.	5.3	tr.	tr.	tr.	3.7
	18:0	21.0	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
	h18:0	7.3	14.1	19.7	15.4	11.7	11.1	12.2
	h20:0	tr.	tr.	3.6	tr.	tr.	tr.	tr.
	22:0	tr.	tr.	3.5	5.3	tr.	tr.	tr.
	h22:0	12.9	31.2	35.2	35.3	28.8	28.5	30.3
	h24:0	20.4	40.6	29.5	44.0	41.0	46.2	53.8
	h24:1	tr.	14.1	tr.	tr.	11.4	9.3	tr.
	p-FA	48.0	-	6.7	5.3	7.1	4.9	-
	h-FA	52.0	100.0	93.3	94.7	92.9	95.1	100.0
LCB	118:0	+	+	+	+	+	+	+

【 図 7 】

茸糖脂質を用いたA型糖脂質の in vitro合成



レーンの酵素反応(酵素あり)では抗A型抗体による免疫反応で染色の中心が検出され、A型糖脂質が in vitroで合成されたことが確認された。

フロントページの続き

- (74)代理人 100091764
弁理士 窪谷 剛至
- (72)発明者 杉田 陸海
滋賀県草津市草津 1 - 6 - 17
- (72)発明者 糸乗 前
滋賀県草津市東矢倉 3 - 39 - 2 - 215
- (72)発明者 榎 泰典
帯広市大空町 12 - 4 - 3 大空町住宅 302 - 104
- (72)発明者 石井 達
帯広市大空町 12 丁目 3 番地 1 大空町住宅 401 - 13
- (72)発明者 大西 正男
帯広市西 2 2 条南 3 丁目 26 - 3
- (72)発明者 木下 幹男
帯広市稲田町西 2 線 15 番地 畜大宿舎 81 - 1号
- (72)発明者 小野 治三郎
神奈川県足柄上郡松田町松田惣領 1407
- (72)発明者 福光 聡
神奈川県相模原市東林間 4 - 34 - 3 日本製粉東林間社宅 203
- (72)発明者 間 和彦
神奈川県横浜市旭区鶴ヶ峰本町 3 - 10 - 6 - 2B
- (72)発明者 小林 洋一
東京都小平市上水本町 6 - 18 - 18
- (72)発明者 山口 昭博
北海道河西郡芽室町東 6 条 6 丁目 1 番地
- (72)発明者 大庭 潔
帯広市西 3 条南 27 丁目 1 - 17 サンブライトハイツ No. 1 - 203号
- (72)発明者 四宮 紀之
帯広市新町西 6 丁目 21 - 2